

University of Groningen

In vitro schildklier diagnostiek

Bakker, Albert

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1961

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Bakker, A. (1961). *In vitro schildklier diagnostiek*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

In dit proefschrift zijn onderzoeken beschreven, die tot doel hadden na te gaan of de bepaling van de "red cell T_3 uptake", zoals deze door Hamolsky en medewerkers is geïntroduceerd, op eenvoudige wijze in een isotopenlaboratorium uitgevoerd kan worden en welke waarde zij voor de kliniek kan hebben. Tevens werd onderzocht of verbeteringen in de methode konden worden aangebracht. Als uitvloeisel van deze experimenten werd nagegaan of de bepaling van de bindingscapaciteit van de thyroxine-bindende eiwitten in het plasma kan leiden tot een beter inzicht in de factoren, die de uitkomst van de "red cell T_3 uptake" bepalen.

In het eerste gedeelte van hoofdstuk I wordt een overzicht gegeven van de literatuur, die betrekking heeft op het transport van schildklierhormonen in het bloed; deze gegevens betreffen vooral het thyroxine, dat specifiek gebonden wordt door die fractie van het plasma, die tijdens de elektroforese in veronalbuffer pH 8.6 een loopsnelheid heeft, welke ligt tussen die van de α_1 - en α_2 -globulinen (inter- α fractie, TBP of TBG genoemd). Nauwkeurige gegevens over de aard van deze fractie zijn niet bekend, evenmin als over de relatie tussen TBP en het later aangetoonde "thyroxine-binding pre-albumine" (TBPA). Over de bindingscapaciteit van TBP voor thyroxine bestaat geen gelijklopend oordeel: volgens sommige onderzoekers is er een significant verschil in de bindingscapaciteit bij hyper-, eu- en hypothyreoïdie, volgens anderen is zij enigszins verhoogd bij hypothyreoïdie en niet afwijkend bij hyperthyreoïdie. Het is bekend, dat de bindingscapaciteit verhoogd is tijdens zwangerschap en bij ernstige leverafwijkingen; bij patienten met nefrose wordt een te lage bindingscapaciteit gevonden.

In het tweede gedeelte van dit hoofdstuk wordt de literatuur besproken, die betrekking heeft op de bepaling der "red cell T_3 uptake" en de resultaten, die hiermee bereikt zijn. De bepaling is vooral zeer goed bruikbaar als een snelle "screening test" en leent zich goed voor het vervolgen van de therapie van hypo- en hyperthyroïde patienten. Naar het oordeel van Crispell c. s. en Christensen is de bepaling uitsluitend een fysisch-chemisch fenomeen en wordt de uitkomst bepaald door de relatieve bindingskrachten van de erythrocyten- en plasma-receptoren voor thyroxine. Dit wordt door Hamolsky en medewerkers betwijfeld.

In hoofdstuk II worden de methodes van onderzoek beschreven. Voor de bepaling van de opneming van trijodothyronine door erythrocyten en hars kan met een eenvoudige apparatuur volstaan worden. De bepaling van de bindingscapaciteit van TBP voor thyroxine vereist een meer uitgebreide apparatuur.

Bij het onderzoek naar de klinische betekenis van de "red cell T_3 uptake" bleek een duidelijke correlatie te bestaan tussen de uitkomsten van deze bepaling en de functie der schildklier. Een groot gedeelte van de waarden, die bij hypothyreoidie gevonden worden, ligt echter in de normale "range", evenals een gedeelte van de waarden, gevonden bij hyperthyroïde patienten. Voor het vervolgen van de therapie bij hypo- en hyperthyroïde patienten bleek de "red cell T_3 uptake" een zeer goed hulpmiddel te zijn. Door Hamolsky c. s. is reeds medegedeeld, dat bij verschillende ziektes een afwijking in de uitkomst kan ontstaan, terwijl de schildklierfunctie normaal is; bij het door ons uitgevoerde onderzoek bleek, dat bij die ziektes, waarbij de pH van het bloed verlaagd is, een te hoge uitkomst gevonden wordt. Bij asthmatische bronchitis werd een hoog normale tot te hoge uitkomst gevonden. Toediening van TSH bleek op de "red cell T_3 uptake" weinig invloed te hebben, terwijl het PBI duidelijk steeg.

In hoofdstuk IV wordt een onderzoek beschreven, dat betrekking heeft op de bindingscapaciteit van TBP voor thyroxine. Dit onderzoek werd mede uitgevoerd naar aanleiding van de conclusie in hoofdstuk III, dat de bindingscapaciteit van de plasma-receptoren voor thyroxine een belangrijke rol speelt bij de bepaling van de "red cell T_3 uptake". De mededeling van Robbins en Rall, dat veronalbuffer voor de bepaling van de bindingscapaciteit van TBP niet geschikt is, omdat schijnbaar geen verzadiging kan worden aangetoond, kon door ons worden bevestigd. Overeenkomstig de mededeling van Ingbar voldeed "tris"-maleaatbuffer wel. Een schijnbare stijging van de bindingscapaciteit van TBP treedt ook bij gebruik van "tris"-maleaatbuffer op, maar pas bij hogere concentraties exogeen thyroxine.

Door de invloed van het buffersysteem en de pH op de opneming van thyroxine en trijodothyronine door de hars Amberlite CG 50 type II te bestuderen, kon worden vastgesteld, dat de waarden, die bij papierelectroforese in "tris"-maleaatbuffer pH 8.6 voor de bindingscapaciteit van TBP werden gevonden, niet fysiologisch zijn: zowel de pH als het buffersysteem verhogen de bindingscapaciteit.

Bij het onderzoek naar de klinische betekenis bleek een significant verschil in de bindingscapaciteit bij hypo-, eu- en hyperthyreoidie te bestaan. De overlapping is echter aanzienlijk. Bij het vervolgen van de therapie bij hypo- en hyperthyroïde patienten bleek de bindingscapaciteit veel minder juist te reageren dan de "red cell T_3 uptake". De conclusie luidde dan ook, dat de bepaling voor de diagnostiek van schildklieraandoeningen geen waarde heeft.

De onderzoeken, beschreven in hoofdstuk III, zijn in drie gedeelten gesplitst: de in het eerste gedeelte beschreven proeven werden verricht om te komen tot een standaard procedure voor de bepaling van de "red cell T_3 uptake"; door de experimenten, beschreven in het tweede gedeelte, werd getracht een beter inzicht te verkrijgen in de factoren, die de uitkomst van deze test bepalen, terwijl in het laatste gedeelte een onderzoek naar de klinische betekenis der bepaling is beschreven.

De bepalingmethode werd zodanig gekozen, dat kleine veranderingen in de proefomstandigheden een zo gering mogelijke invloed hebben. Dit bleek zeer goed mogelijk voor de incubatieduur en -temperatuur, evenals voor het volume van het in bewerking te nemen bloed. Correctie voor de hematocriet door vermenigvuldiging met de factor 100/hematocriet, zoals deze door Hamolsky c. s. wordt toegepast is ons inziens onjuist. Bij de door ons gevolgde methode wordt het bloed vóór de bepaling op een hematocriet van ongeveer 40 gebracht. Het is noodzakelijk steeds hetzelfde anticoagulans te gebruiken.

Bij de vergelijking van de "red cell T_3 uptake" en de "red cell T_4 uptake" bleek, dat het thyroxine in veel mindere mate dan trijodothyronine door de erythrocyten wordt opgenomen. Aange-toond werd, dat dit veroorzaakt wordt door het feit, dat de eerstgenoemde verbinding veel sterker aan de plasma-eiwitten wordt gebonden dan laatstgenoemde. De binding aan de erythrocyten verschilt in zoverre, dat het thyroxine meer aan de oppervlakte vastgehouden wordt, terwijl het trijodothyronine de rode cellen in groter mate binnendringt.

Behalve de "red cell uptake" van trijodothyronine werd ook die van thyroxine en van secundair natriumfosfaat, gemerkt met P-32, onderzocht; deze laatste bepaling is beschreven door Farran en medewerkers (1959). Een duidelijke correlatie tussen de uitkomsten van deze bepalingen en de schildklierfunctie kon niet worden aangetoond.

Door kruisproeven werd aangetoond, dat de aard van het plasma bepalend is voor de opneming van trijodothyronine door de erythrocyten. Uitgaande van de veronderstelling, dat de thyroxine-spiegel in het plasma de bepalende factor bij de bepaling zou zijn werd nagegaan of de "red cell T_3 uptake" in normaal bloed tot "hyperthyroïde" waarden stijgt door voorafgaande incubatie met inactief thyroxine. Een stijging werd aangetoond, doch de hoeveelheden thyroxine, die hiervoor nodig waren, bleken veel hoger te zijn dan die welke bij hyperthyreoidie aangetroffen worden. Uit deze proeven werd geconcludeerd, dat de uitkomsten van de "red cell T_3 uptake" gedeeltelijk bepaald worden door de thyroxine-spiegel in het plasma en gedeeltelijk door de bindingscapaciteit van de plasma-receptoren voor thyroxine.

Bij het in hoofdstuk V beschreven onderzoek werd uitgegaan van de in hoofdstuk III vermelde conclusie, dat de aard van het plasma de uitkomst van de "red cell T_3 uptake" bepaalt. Vervanging van de erythrocyten door een synthetische stof heeft het belangrijke voordeel, dat een variabele factor wordt geëlimineerd. Van de met dit doel onderzochte stoffen bleek de hars Amberlite CG 50 type II het meest geschikt. De bepalingsmethodiek werd gestandaardiseerd en de opneming van thyroxine en trijodothyronine door deze hars werd bij een aantal hypo-, eu- en hyperthyroide patienten onderzocht. Evenals bij de "red cell uptake" bleek ook hier de opneming van trijodothyronine een grotere diagnostische waarde te hebben dan die van thyroxine. De bepaling van de opneming van trijodothyronine door Amberlite CG 50 type II geeft betere resultaten dan de "red cell T_3 uptake": de standaarddeviatie van de bepaling is relatief kleiner, terwijl de overlapping tussen "normale" en "hyperthyroide" waarden minder is.

SUMMARY

In this thesis investigations are reported about the usefulness of the red cell triiodothyronine uptake test, introduced by Hamolsky and colleagues, as an index of thyroid function. The applicability of this procedure to conditions in a routine isotope laboratory was investigated and the possibility to effect improvements. By studying the binding capacity of the thyroxine-binding protein (TBP) an effort was made to get a better understanding of the factors that influence the results of the test.

The first part of chapter I gives a survey of the literature that appeared about the transport of thyroid hormones. It deals particularly with thyroxine, which is specifically bound to a plasma-moiety which shows an electrophoretic mobility at pH 8.6 between the α_1 and α_2 globulins; this moiety has been called inter- α fraction, TBP or TBG. Some years later Ingbar showed a second plasma-moiety to have strong thyroxine-binding properties: thyroxine-binding pre-albumin (TBPA). The exact nature of the thyroxine-binding protein is not known any more than the relationship between TBP and TBPA.

As to the binding capacity of TBP there is no uniform opinion: according to Albright, Larson and Deiss there is a difference in binding-capacity between hypo-, eu- and hyperthyroid subjects. However, these authors used veronal buffer in their electrophoresis-system and it was pointed out by Robbins and colleagues that this buffer didn't do well in a normal paper electrophoresis-system, because increasing quantities of thyroxine become associated with TBP as the thyroxine-concentration is increased over a wide range. Using the so-called reverse-flow paper electrophoresis they could find a saturation-plateau for the thyroxine-binding capacity. This capacity appeared to be slightly elevated in cases of hypothyroidism and not to be altered in cases of hyperthyroidism. It is known, that the binding-capacity is elevated during pregnancy and in cases of severe liver disease; a decrease is found in nephrotic patients.

In the second part of this chapter the literature is discussed that deals with the assessment of the red cell T_3 uptake and the results that have been obtained with this procedure. The test is very useful as a rapid screening test and in following and gauging the adequacy of therapy of hyperthyroidism and hypothyroidism. According to Crispell c. s. and Christensen the red cell triiodothyronine test is a physico-chemical phenomenon, depending solely on the serum level of non-saturated thyroid hormone receptors. This is doubted by Hamolsky and colleagues.

In chapter II a description is given of the methods used. For the determination of the red cell and resin triiodothyronine uptake only a simple apparatus is needed. A more complicated apparatus is necessary for the determination of the thyroxine-binding capacity of TBP.

The investigations described in chapter III, are divided into three parts: the experiments of the first part were undertaken to standardise the procedure for determining the red cell T_3 uptake; by means of the experiments of the second part an effort was made to get a better understanding of the factors that determine the result of the test and in the last part an investigation is described about the clinical usefulness of the test.

The method to determine the red cell T_3 uptake was chosen in such a way that small differences in the procedure would have the smallest possible influence on the results of the test. This could be done easily with regard to the incubation-period and -temperature and the blood-volume. Correction to a hematocrit of 100 by multiplication with 100/hematocrit, as it is done by Hamolsky c. s., is in our opinion not right. In the procedure followed by us, we always adjust the hematocrit before the test is done to 40. It is necessary to use the same anticoagulant every time.

Comparing the red cell T_3 uptake and the red cell T_4 uptake it appeared that the quantity of thyroxine taken up by erythrocytes is much less than that of triiodothyronine. The fact that thyroxine is bound more firmly to plasma-proteins than triiodothyronine, was shown to be the cause of this observation. The binding of the two compounds differs in that thyroxine is bound more at the surface of the erythrocytes, while triiodothyronine enters the red cells in a greater quantity. No good correlation was found between the red cell T_4 uptake and thyroid function, no more than between the red cell $P-32$ uptake and thyroid function.

It was shown by criss-cross experiments that the properties of the plasma determine the result of the red cell triiodothyronine uptake test. Supposing that the thyroxine-level in plasma would be the factor that determines the T_3 uptake, investigations were made whether the red cell T_3 uptake increases to a hyperthyroid level by previous incubation of the blood sample with increasing quantities of thyroxine. This happened to be the case, but the quantity of thyroxine necessary for this increase was much higher than that usually found in cases of hyperthyroidism. It was concluded from these experiments, that the results of the red cell T_3 uptake test are determined partially by the thyroxine-level in the plasma and partially by the binding-capacity of plasma-receptors for thyroxine.

Investigating the clinical significance of the red cell T_3 uptake test, a close correlation was shown to exist between the results of this test and thyroid function. However, the greater part of the values found in hypothyroidism happened to lie in the normal range, just as a minor part of the "hyperthyroid" values. The red cell T_3 uptake appeared to be very useful in following the adequacy of therapy of hyperthyroidism and hypothyroidism.

Hamolsky c. s. found a decrease or increase in some diseases where thyroid function was normal; in the course of our own investigations it appeared that abnormal values were also found in those diseases in which the pH of the blood has decreased. In cases of chronic bronchitis values somewhat higher than normal were found. Administration of TSH seemed to have only a slight effect on the red cell T_3 uptake, whereas the PBI increased distinctly.

The investigations reported in chapter IV, deal with the thyroxine-binding capacity of TBP. These studies were undertaken consequent on the conclusion in chapter III, that the binding capacity of plasma-receptors for thyroxine seems to play an important role in determining the results of the red cell T_3 uptake test. The observation of Robbins and Rall that veronal-buffer is not suited for the determination of the thyroxine-binding capacity of TBP, could be confirmed. According to Ingbar "tris"-maleate-buffer appeared to be well suited for this determination. Using "tris"-maleate-buffer the binding capacity of TBP seems to rise too when employing greater quantities of exogenous thyroxine.

Studying the influence of the buffer solution and the pH on the uptake of triiodothyronine and thyroxine by the resin Amberlite CG type II it could be shown, that values found for the binding capacity of TBP during paperelectrophoresis in "tris"-maleate-buffer pH 8.6 are not physiologic ones; the pH as well as the buffer solution gives an increase of the binding capacity.

Investigating the clinical value of the determination, a significant difference appeared to exist between the binding capacity in hypo-, eu- and hyperthyroidism. However there is a considerable overlapping. Following the effect of therapy of hypo- and hyperthyroid patients the binding capacity appeared to be not so useful as the red cell T_3 uptake. It was therefore concluded, that the determination of the binding capacity of TBP has as yet no diagnostic value.

The investigations reported in chapter V are based on the conclusion in chapter III that the properties of the plasma determine the results of the red cell T_3 uptake test. Substituting the erythrocytes by a synthetic material has the great advantage that a variable factor is eliminated. Investigating a lot

of materials Amberlite CG 50 type II appeared to be the most useful one. The procedure was standardised and the thyroxine and triiodothyroxine uptake by this resin was investigated in cases of hypo-, eu- and hyperthyroidism. As with the red cell T_3 uptake test the uptake of triiodothyronine appeared to give better results than that of thyroxine. The determination of the triiodothyronine uptake by Amberlite CG 50 type II gave better results than that of the red cell T_3 uptake.